



CATÓLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO EM PAPEL PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE FERRO SALIVAR

por

Karina Acciainoli Catalão

Novembro 2019



CATÓLICA

ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO EM PAPEL PARA A QUANTIFICAÇÃO DE FERRO SALIVAR

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa para
obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

por

Karina Acciainoli Catalão

Local: Escola Superior de Biotecnologia – Universidade Católica Portuguesa

Orientação: Prof.^a Doutora Raquel Mesquita e Prof. Doutor António Rangel

Novembro 2019

Resumo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um dispositivo baseado em papel (μ PAD) para a quantificação de ferro salivar uma vez que esta determinação pode constituir um potencial exame diagnóstico complementar para patologias como o cancro oral e a anemia.

Para tal, desenvolveu-se um μ PAD para quantificar ferro baseado na reação colorimétrica entre a batofenantrolina dissulfônica (BPS) e o catião ferro. O dispositivo possui um intervalo de aplicabilidade de 0,125 a 0,750 mg/L, com limites de deteção e quantificação de 0,034 mg/L e 0,091 mg/L, respetivamente. A estrutura final do μ PAD apresenta duas camadas de papel de filtro *Whatman* 1 entre uma bolsa de plastificar. A camada superior possui um diâmetro de 9,5 mm, onde são adicionados 10 μ L de solução reagente contendo BPS e hidroxilamina, e a camada inferior possui um diâmetro de 14 mm. Este dispositivo permanece estável quer a vácuo quer em contato com o ar durante pelo menos 1 mês. A digitalização do dispositivo deve ser feita entre 20 a 60 minutos após a adição da amostra.

A exatidão da quantificação de ferro pelo dispositivo desenvolvido foi avaliada através da utilização de amostras de água certificadas, sendo ainda necessário otimizar a aplicação do método para amostras de saliva devido a presença de interferentes na matriz salivar.

Sendo assim, é possível concluir que o método desenvolvido permite quantificar de forma portátil, rápida e fácil o ferro em águas, o que o torna ideal para utilização em locais com recursos reduzidos, mas são necessários trabalhos futuros para otimizar a sua aplicação em amostras salivares.

Palavras-chave: μ PAD; ferro; saliva

Abstract

The aim of this work was to develop a microfluidic paper-based analytical device (μ PAD) for salivary iron quantification, as this determination may constitute a potential complementary diagnostic test for diseases such as oral cancer and anemia.

For this purpose, based on the colorimetric reaction between bathophenanthroline disulfonic acid (BPS) and iron cation, a μ PAD was developed to quantify iron. The device has an applicability range of 0.125 to 0.750 mg/L, with detection and quantification limits of 0.034 mg/L and 0.091 mg/L, respectively.

The final structure of the μ PAD consists of two layers of *Whatman* filter 1 between a plastic laminating pouch. The top layer, where 10 μ L of reagent solution containing BPS and hydroxylamine are added, has a diameter of 9.5 mm and the bottom layer has a diameter of 14 mm. This device remains stable both under vacuum and in contact with air for at least 1 month. The device should be scanned 20 to 60 minutes after sample addition.

The accuracy of the iron quantification by the developed device was evaluated using certified water samples. It's still necessary to optimize the application of the method for saliva samples due to the presence of interfering salivary matrix.

Thus, it can be concluded that the developed method allows portable, fast and easy quantification of iron in waters, which makes it ideal for use in low resource locations, but further work is needed to optimize its application in salivary samples.

Keywords: μ PAD; iron; saliva

Índice

Resumo.....	III
Abstract.....	V
1. Introdução	1
1.1. A Saliva.....	1
1.2. O ferro na saliva	2
1.3. Análise em papel.....	4
1.4. Determinação colorimétrica de ferro	8
1.5. Objetivo	9
2. Material e métodos	10
2.1. Reagentes e soluções.....	10
2.2. Dispositivo em papel (μ PAD) para determinação de Fe(III)	10
2.2.1. Montagem do μ PAD	10
2.2.2. Procedimento para determinação do Fe(III).....	11
2.3. Amostragem.....	12
2.4. Amostra certificada de água	12
3. Resultados.....	13
3.1. Estudo da seleção do reagente.....	13
3.1.1. Escolha do reagente - ensaios <i>in vitro</i>	13
3.1.1.1. Taxa de conversão de Fe(III) em Fe(II).....	14
3.1.2. Estudo do reagente - ensaios em μ PAD	17
3.2. Desenvolvimento do μ PAD para a determinação de Fe(III)	18
3.2.1. Estudo das camadas hidrofílicas.....	18
3.2.2. Estudo da concentração de BPS	21

3.2.3.	Estudo do volume de reagente	22
3.2.4.	Estudo do volume de amostra	24
3.2.5.	Estudo da percentagem de conversão de Fe(III) a Fe(II).....	24
3.3.	Estudo de interferências	25
3.3.1.	Estudo de interferências da matriz da amostra	25
3.3.2.	Estudo da interferência do Cu(II)	26
3.4.	Estudos de estabilidade no dispositivo	27
3.4.1.	Estudo da estabilidade do produto de reação.....	28
3.4.2.	Estudo da estabilidade do dispositivo	29
3.5.	Aplicação – estudo da exatidão da determinação.....	30
3.5.1.	Amostra certificada de água	30
3.5.2.	Amostras de saliva	30
3.6.	Características do μ PAD	31
4.	Conclusão e sugestões de trabalho futuro	34
Anexo.....		35
I.	Características gerais dos papeis de filtro <i>Whatman</i>	35
Referências.....		36

1. Introdução

1.1. A Saliva

A saliva é um fluido presente na cavidade oral produzido maioritariamente pelas três principais glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual). As secreções produzidas pelas glândulas salivares menores, bem como o fluido gengival crevicular e as secreções oro-naso-faríngeas, assim como a presença de bactérias e respetivos metabolitos, células epiteliais descamadas e resíduos alimentares, também contribuem para a formação e/ou composição da saliva. Desta forma, este fluido exócrino, constituído por aproximadamente 99% de água, contém diversos eletrólitos (por exemplo potássio, cloreto, sódio e bicarbonato), proteínas (imunoglobulinas e enzimas) e glicoproteínas, excretas nitrogenadas (ureia e amónia), glucose, detritos celulares e alimentares, entre outros compostos.

O volume de fluido salivar produzido num dia por um adulto saudável varia entre 0,5-1,5 L, aproximadamente [1,2]. No entanto, ambos o volume e a composição salivar podem variar ao longo do dia e de indivíduo para indivíduo, podendo ser alterados por diversos fatores como tipo de nutrição, nível de hidratação, toma de medicamentos, stress, entre outros [2].

O fluido salivar desempenha variadas funções, entre as quais facilitar a deglutição, iniciar o processo de digestão e preservar o equilíbrio oral, através da lubrificação/proteção dos tecidos, da atuação como solução-tampão, da ação antibacteriana e da manutenção da integridade dentária [1,2]. Nos últimos anos o interesse no fluido salivar tem vindo a aumentar, observando-se um aumento do número de estudos acerca do potencial deste fluido biológico como ferramenta de diagnóstico clínico (figura 1).

O facto de a saliva ser um fluido biológico de fácil manuseio e amostragem e recolha não-invasiva representam vantagens para ambos o operador e o utente, aumentando o seu potencial como exame complementar de diagnóstico e acompanhamento da eficácia dos tratamentos utilizados, quer para doenças orais ou sistémicas. Para este fim, utiliza-se a saliva total (mistura de secreções presente na cavidade oral) ou específica de uma glândula, podendo a amostragem ser feita de modo estimulado e não-estimulado, e aplicam-se métodos de sialometria (medição do fluxo salivar) e sialoquímica (doseamento de componentes orgânicos e inorgânicos) [1,2,3,4].

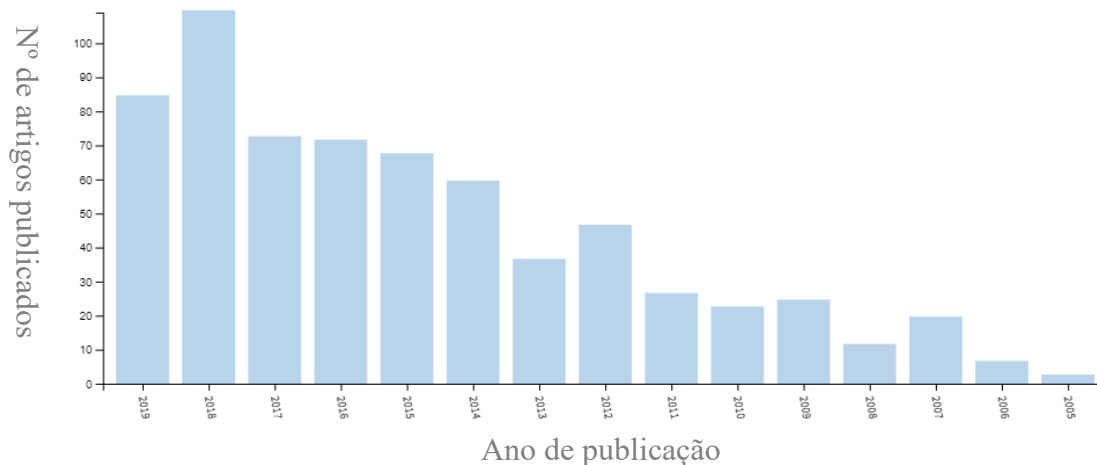


Figura 1 – Evolução do número de estudos acerca da saliva como ferramenta de diagnóstico nos últimos 15 anos de acordo com pesquisa no ISI Web of Knowledge “saliva” e “biomarkers” e “diagnostic” em 18/10/2019.

1.2. O ferro na saliva

O ferro é um elemento presente na saliva em reduzida quantidade. A maior parte deste não existente na saliva encontra-se ligada a uma proteína designada lactoferrina. Esta proteína, presente no fluido salivar, possui uma função antibacteriana, pois ao interagir com o ferro limita a quantidade livre deste, e, conseqüentemente, impede/controla a proliferação de bactérias que necessitam deste elemento para sobreviver e proliferar [1,5].

A potencial relação do ferro salivar com patologias tais como o câncer oral, a anemia e a talassemia tem vindo a ser alvo de cada vez mais estudos nos últimos anos (tabela 1). No entanto, dado que o interesse na saliva como fluido diagnóstico é recente, mais recente ainda é o interesse no potencial diagnóstico do ferro salivar, de forma que ainda não há consenso/concordância nos valores de ferro presentes na saliva. Isto pode-se dever ao facto de os estudos serem conduzidos em diferentes populações e a composição salivar ser afetada por diversos fatores (idade, alimentação, etc).

Tabela 1 – Quadro resumo das diferentes concentrações de ferro salivar descritas na literatura.

Valores de concentração de ferro salivar na literatura						Ref.
Controle	Anemia	Talessemia	Leucoplasia Oral	Fibrose Submucosa Oral	Carcinoma Oral de Células Escamosas	
5,58 - 55,8 µg/L	x	x	x	x	x	[6]
760 µg/L	x	x	470 µg/L	357 µg/L	368 µg/L	[7]
742 mg/L	246 mg/L	2536 mg/L	x	x	x	[8]
94 µg/L	x	x	x	x	x	[9]
0,524 mg/L	x	x	x	0,140 mg/L	x	[10]
0,68 - 1,26 µg/L	0,10 - 0,42 µg/L	x	x	x	x	[11]
663 µg/L	x	x	x	x	x	[12]
31,8 mg/L	x	x	x	x	41,3 mg/L	[13]
725 µg/L	x	x	528 µg/L	360 µg/L	339 µg/L	[14]
159 µg/L	x	x	x	104 µg/L	x	[15]

O doseamento de ferro salivar, tal como o doseamento de cátions metálicos em outros fluidos biológicos, é convencionalmente realizado através de espectrofotometria de absorção atômica (EAA), espectrofotometria de absorção molecular e elétrodos seletivos de iões (ISE) [3]. Apesar de ser um método muito sensível, reproduzível e rápido, a espectrofotometria de absorção atômica é afetada pela viscosidade da amostra e requer infraestrutura adequada [16]. A espectrofotometria de absorção molecular, apesar de ser mais económica que a EAA, não é tão sensível e requer manipulação de reagentes. Os elétrodos seletivos de iões são portáteis e permitem realizar quantificações rápida e facilmente, porém, podem implicar volumes elevados de amostra (ou maior diluição desta) dependendo da dimensão do eletrodo [17].

Desta forma, dado este enquadramento, seria interessante o desenvolvimento de um método alternativo que permitisse o doseamento de ferro de forma rápida, portátil e económica. Para este fim, os métodos de análise em papel têm ganho um crescente interesse.

1.3. Análise em papel

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), é necessário o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico para países em desenvolvimento, onde os recursos são limitados. Segundo a OMS, os dispositivos devem ser de baixo custo, sensíveis, específicos, fáceis de utilizar, rápidos e robustos, e não devem necessitar de instalações especializadas [18].

Em resposta a esta necessidade surgiram os dispositivos microfluídicos baseados em papel (μ PAD – “microfluidic paper-based analytical device”), uma tecnologia recente que tem sido alvo de cada vez mais estudos (figura 2). Este método combina dois métodos de análise já existentes: a análise microfluídica convencional e a análise diagnóstica em tiras teste [18]. A microfluídica convencional utiliza volumes reduzidos de reagentes e amostras para realizar determinações quantitativas em “chips”, podendo ou não necessitar de fontes de energia externa [19]. Já a análise diagnóstica em tiras teste (papel), convencionalmente utilizada em determinações qualitativas, é uma técnica simples e económica, onde os movimentos microfluídicos são promovidos por fenómenos de capilaridade e evaporação, dispensando assim fontes de energia externa. Deste modo, a combinação destes métodos permite obter um método de análise simples, de baixo custo e sem fontes externas de energia para realizar determinações quantitativas [18,20].



Figura 2 – Evolução do número de artigos publicados sobre dispositivos baseados em papel nos últimos 15 anos de acordo com pesquisa no ISI Web of Knowledge “microfluidic paper based analytical device” em 18/10/2019.

A fabricação dos μ PADs baseia-se na criação de zonas hidrofílicas delimitadas por barreiras hidrofóbicas químicas ou físicas. A zona hidrofílica, constituída pelo papel, corresponde à zona de teste, onde ocorre a reação entre o reagente e a amostra. A utilização de papel como substrato para fins analíticos deve-se a diversos motivos: as fibras de celulose que constituem o papel, para além de promoverem o movimento dos fluidos por capilaridade, são compatíveis com amostras biológicas; é possível aplicar tratamentos químicos ao papel de modo a incorporar grupos funcionais para ligarem-se a moléculas específicas; normalmente apresenta uma cor branca, ideal para testes colorimétricos devido ao contraste gerado com o produto colorido; é facilmente descartável por incineração; é económico e “prontamente disponível”; é flexível, leve e fácil de transportar [18,20].

A delimitação da zona hidrofílica é feita por zonas hidrofóbicas, que podem ser constituídas por barreiras químicas ou separações físicas (corte do papel filtro) (figura 3). No caso das barreiras químicas, estas podem ser obtidas de forma direta, através da deposição de agentes hidrofóbicos na configuração pretendida sobre a superfície do papel de filtro (ex: impressão a cera, impressão a tinta, impressão flexográfica, e mais recentemente impressão a laser [21]) ou indireta, onde são necessárias diversas etapas para se obter a configuração desejada da zona hidrofóbica (ex: fotolitografia) [22]. É importante notar que os agentes hidrofóbicos devem impregnar toda a

espessura do papel para criar a zona hidrofóbica. Deste modo, a largura e o comprimento dos canais microfluídicos são definidos pelas zonas hidrofóbicas, enquanto que a altura do canal é definida pela espessura do papel utilizado [18].

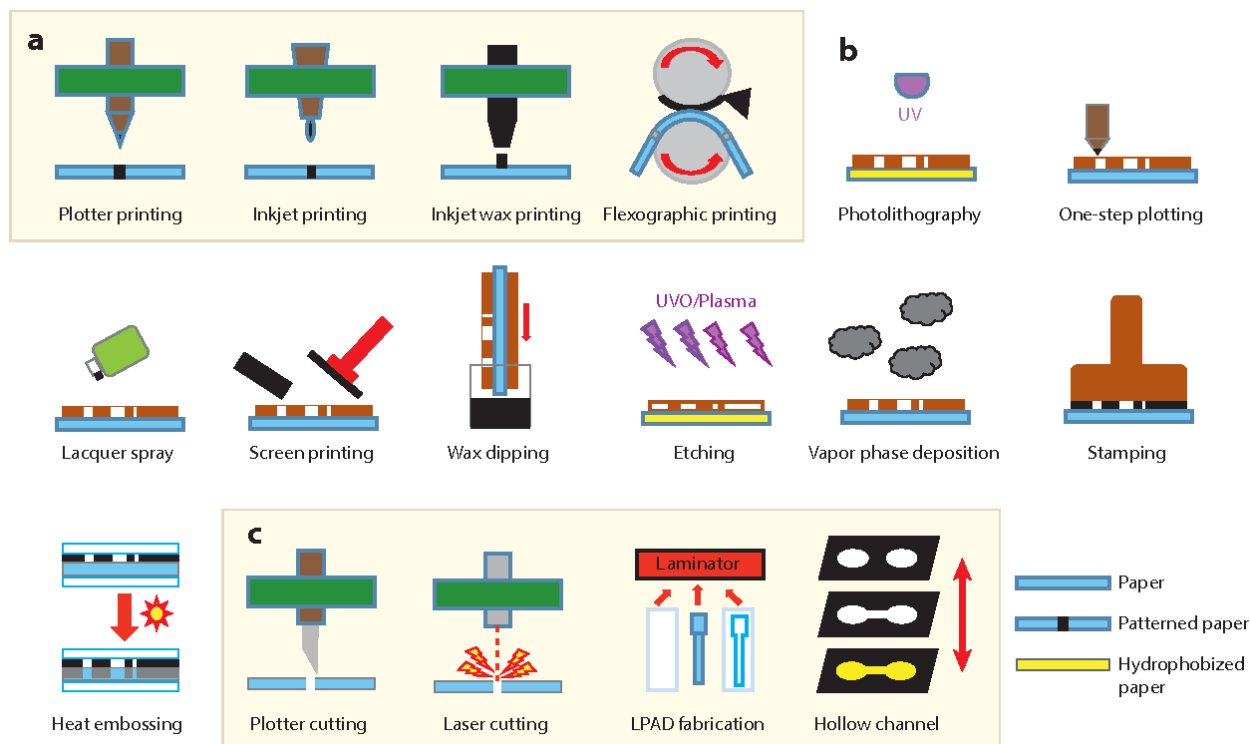


Figura 3 – Diferentes tipos de técnicas de fabricação de μ PADs; a– métodos para delimitar a zona hidrofílica através de barreiras químicas obtidas de forma direta; b– métodos para delimitar a zona hidrofílica através de barreiras químicas obtidas de forma indireta; c– métodos para delimitar a zona hidrofílica através de barreiras físicas [23].

A última etapa na fabricação dos μ PADs consiste na adição de reagentes, muitas vezes colorimétricos, para a análise da substância desejada.

É possível potencializar ainda mais estes dispositivos através da utilização de mais camadas de papel. Os dispositivos constituídos por uma camada de papel apenas permitem criar sistemas microfluídicos bidimensionais (transporte lateral de fluidos). A adição de mais camadas de papel por, por exemplo, colagem de várias camadas ou simplesmente dobrando uma folha de papel, cria sistemas microfluídicos tridimensionais (transporte lateral e vertical de fluidos). Através destes sistemas é possível criar redes de teste complexas, que permitem, por exemplo, dosar diferentes

analitos com a mesma amostra, ou explorar as funcionalidades características de cada tipo de papel, utilizando, por exemplo, uma camada superior para filtrar substâncias/moléculas indesejadas presentes numa amostra (figura 4) [18,20].

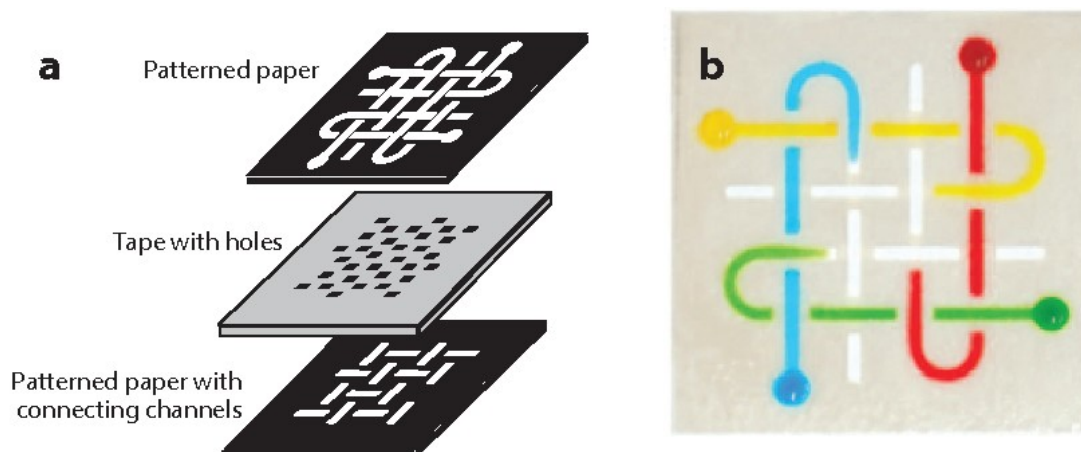


Figura 4 – Exemplo de estrutura de um μ PAD tridimensional (a– esquema de montagem; b– estrutura final), adaptado de [23].

Como já foi referido, as características do μ PAD o tornam ideal para análises colorimétricas, de modo que apesar de ser possível utilizar métodos de deteção eletroquímicos, fotoeletroquímicos e de luminescência, a deteção colorimétrica é a mais prevalente nos estudos até a data [20].

A deteção colorimétrica pode ser qualitativa, através da comparação visual do produto colorido com uma tabela modelo, ou quantitativa, através da medição da intensidade de cor do produto colorido. No caso da quantificação quantitativa, a informação da intensidade de cor é obtida através da imagem digital da zona de teste (zona hidrofílica), onde se forma o substrato colorido. Os dispositivos de captura de imagem mais utilizados são scanners portáteis, câmaras digitais e smartphones, uma vez que a portabilidade e facilidade de uso são características essenciais deste método analítico [20].

Através de programas de análise de cor (por exemplo, o *ImageJ*), é possível converter a imagem digital para o formato RGB e seleccionar a zona de teste, obtendo-se assim a média da intensidade de cor da zona de interesse. É importante referir que o produto colorido pode não se distribuir de modo uniforme no papel, de forma que a zona seleccionada pode corresponder ou não à totalidade da zona de teste. Por esse mesmo motivo, para obter melhores resultados é recomendável remover

os dados “outliers” e realizar réplicas de modo a reduzir o erro que pode advir da distribuição desigual do produto colorido.

Por fim, os valores de intensidade de cor podem ser então convertidos em valores de “pseudo-absorvância” através da Lei de Beer-Lambert e, desta forma, relacionados com valores de concentração [20].

Deste modo, esta tecnologia permite realizar quantificações de diversas substâncias de forma rápida, económica e fácil. Estas características, aliadas a praticidade e portabilidade deste método, o tornam ideal para a realização de análises diagnósticas, ambientais ou de alimentos e águas em locais com recursos limitados [20].

1.4. Determinação colorimétrica de ferro

Uma vez que a análise de ferro salivar pode constituir uma ferramenta complementar de diagnóstico, seria interessante dispor de um método que possibilitasse a determinação deste elemento de forma rápida, portátil, simples e económica. Para este fim, os dispositivos em papel parecem ter elevado potencial, especialmente quando se baseiam em métodos de deteção colorimétricos.

Ao longo dos anos foram descritas várias reações colorimétricas para a determinação de ferro. Um dos métodos mais conhecidos, presente na literatura desde 1837 [24], é a quantificação deste metal utilizando o anião tiocianato (SCN^-). Este anião reage com o Fe(III) em meio ácido numa proporção de 1:1, formando um complexo de cor vermelha alaranjada intensa [25]. Outras abordagens mais recentes envolvem a utilização de agentes quelantes, tais como a batofenantrolina dissulfónica (BPS) [26] e o CP256 (hidroxipiridinona) [27]. O BPS é um ligando bidentado que reage com o Fe(II) em meio com pH 4-7, numa proporção de 3:1, formando um complexo de cor rosa intensa (figura 5) [26]. Já o CP256, recentemente sintetizado em 2010, é um ligando hexadentado que reage com o Fe(III) em meio básico numa proporção de 1:1, formando um complexo de cor alaranjada [27,28].

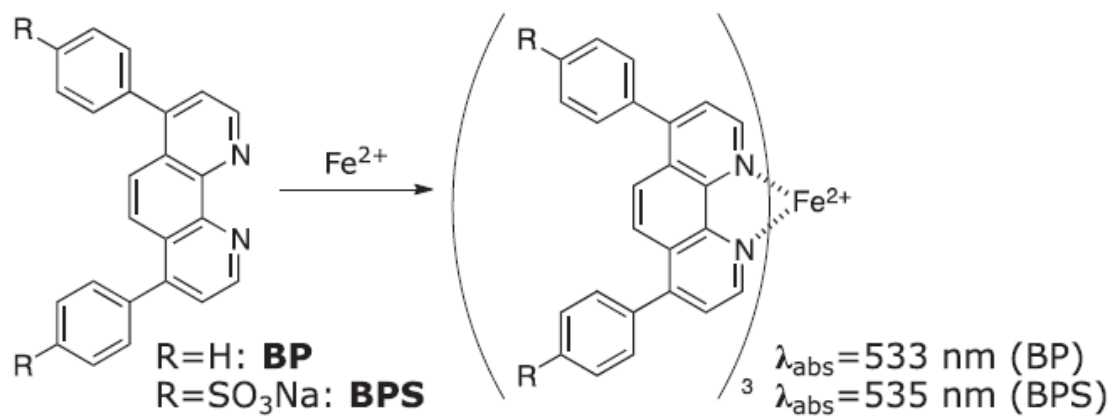


Figura 5 - Esquema da reação colorimétrica entre o BPS e o ferro, adaptado de [26].

1.5. Objetivo

O objetivo deste projeto foi desenvolver um dispositivo em papel para a quantificação rápida de ião ferro em amostras de saliva, com base numa reação colorimétrica. O dispositivo deverá ser de fácil manipulação, estável, descartável, de baixo custo e de aplicação *in situ*.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes de elevado grau de pureza e água Milli-Q (resistividade > 18 MΩ cm, Millipore, Bedford, MA, EUA).

Preparou-se a solução redutora de hidroxilamina 15 g/L de acordo com [29], dissolvendo 3 g do reagente (Sigma-Aldrich) em 18 mL de ácido clorídrico (Merck) de 4 M, perfazendo-se até um volume de 200 mL com água (0,36 M HCl).

A solução de batofenantrolina dissulfônica (BPS) 1 mg/mL foi preparada através da diluição de 100 µL de solução-mãe em 10,0 mL de água, que por sua vez foi obtida através da dissolução de 1,000 g de BPS (Alfa Aesar) em 10,0 mL de água [25].

A solução reagente é uma mistura da solução redutora com a solução de BPS, na proporção de 1:0,4 (1 mL de BPS e 0,4 mL de hidroxilamina).

Foram preparadas soluções padrão de Fe(III) de 0,125-0,750 mg/L a partir de uma solução intermédia de 50,0 mg/L que, por sua vez, foi preparada através da diluição de 0,50 mL de solução padrão de 1000 mg/L de Fe(III) (Sigma-Aldrich) em 10,0 mL de água.

A saliva sintética preparada foi baseada em [30]. Para 1 L de saliva pesou-se 2250 mg de KCl (Merck), 544 mg de KH₂PO₄ (Merck) e 4775 mg de HEPES (Sigma) e 78 mg de CaCl₂.2H₂O (Merck). Posteriormente adicionou-se 675 mg de BSA (Sigma) a 250 mL de saliva sintética.

2.2. Dispositivo em papel (µPAD) para determinação de Fe(III)

2.2.1. Montagem do µPAD

A montagem do dispositivo foi feita de modo a conjugar zonas hidrofílicas e zonas hidrofóbicas, utilizando círculos de papel de filtro fisicamente separados em bolsas de plástico (figura 6). Os papéis de filtro utilizados foram *Whatman* 1 (“Hardened Ashless”) de 9,5 mm de diâmetro na camada B e 14 mm de diâmetro na camada C. As bolsas de plastificar, que consistem nas camadas A e D, foram da Fellowes (75x105 mm, acabamento brilhante). Os círculos hidrofílicos de papel

de filtro foram obtidos através de perfuradores cilíndricos com os diâmetros referidos anteriormente e os furos nas bolsas de plastificar, de 5 mm de diâmetro (camada A) foram feitos com um alicate de perfuração giratório (KNIPEX).

Aos papeis de filtro da camada B adicionou-se 10 μL de solução reagente e colocou-se a secar na estufa a 50°C durante 10 minutos. De seguida, procedeu-se à montagem do μPAD por sobreposição dos círculos de papel filtro da camada B (impregnados com solução reagente) foram posicionados acima dos da camada C (não-impregnados). Após o alinhamento dos círculos, procedeu-se ao processo de plastificação (plastificadora L125 A4) para criar uma área hidrofóbica que delimitasse as zonas hidrofílicas.

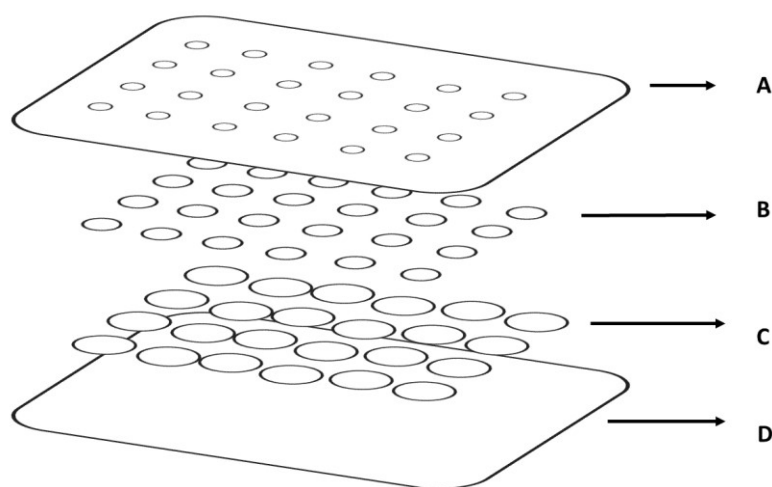


Figura 6 - Esquema de montagem do dispositivo; A– camada hidrofóbica superior, B– camada hidrofílica com reagente, C– camada hidrofílica de reservatório, D– camada hidrofóbica inferior.

2.2.2. Procedimento para determinação do Fe(III)

Após a adição da amostra (25 μL), através das aberturas criadas na camada A, esperou-se 20 minutos para promover a reação e garantir que o μPAD não estivesse húmido antes de se realizar a digitalização da imagem (Epson Stylus SX100). As imagens dos dispositivos, obtidas em formato JPG, foram convertidas em formato RGB (filtro verde) com o software *ImageJ*, através do qual se

seleciona a área de interesse da imagem e calcula-se a média da intensidade de cor desta. Dado que o produto colorido da reação é cor de rosa, a leitura da intensidade dos pixels foi feita com o filtro verde (cor complementar). Com a aplicação Excel, os dados obtidos foram convertidos em valores de absorvância através da lei de Beer-Lambert:

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_s} \right)$$

A – valor de absorvância; I_s – valor médio da intensidade dos pixels da zona colorida (produto obtido); I_0 – valor médio da intensidade dos pixels do branco [20].

2.3. Amostragem

A amostragem realizou-se colocando uma gaze esterilizada na cavidade oral durante cerca de 1 minuto. Para cada 1 mL de amostra adicionou-se 2 mL de ácido nítrico a 0,01 M (amostras sem adição) ou 2 mL de Fe(III) 0,5 mg/L (amostras com adição).

2.4. Amostra certificada de água

A avaliação da exatidão do dispositivo desenvolvido foi feita através da utilização de uma amostra de água certificada, ERM CA615, contendo Fe(III). A amostra foi diluída de modo a que a concentração de Fe(III) estivesse no intervalo de aplicabilidade do método.

3. Resultados

3.1. Estudo da seleção do reagente

3.1.1. Escolha do reagente - ensaios *in vitro*

Foram estudadas reações químicas colorimétricas entre o íon ferro e diferentes agentes complexantes, nomeadamente o CP256, SCN^- e BPS, através da espectroscopia de absorção molecular a fim de avaliar as sensibilidades de cada reação e, consequentemente, a forma mais eficaz de quantificar este elemento. Para tal, foram realizados os espectros de absorção dos produtos de cada reação para verificar o comprimento de onda ao qual correspondia a absorvância máxima, obtendo-se os valores de 456, 480 e 535 nm para os complexos formados com o CP256, SCN^- e BPS, respetivamente. De seguida, utilizando soluções-padrão de Fe(III) entre 0,2 a 2,0 mg/L, realizaram-se curvas de calibração utilizando os diferentes reagentes (figura 7).

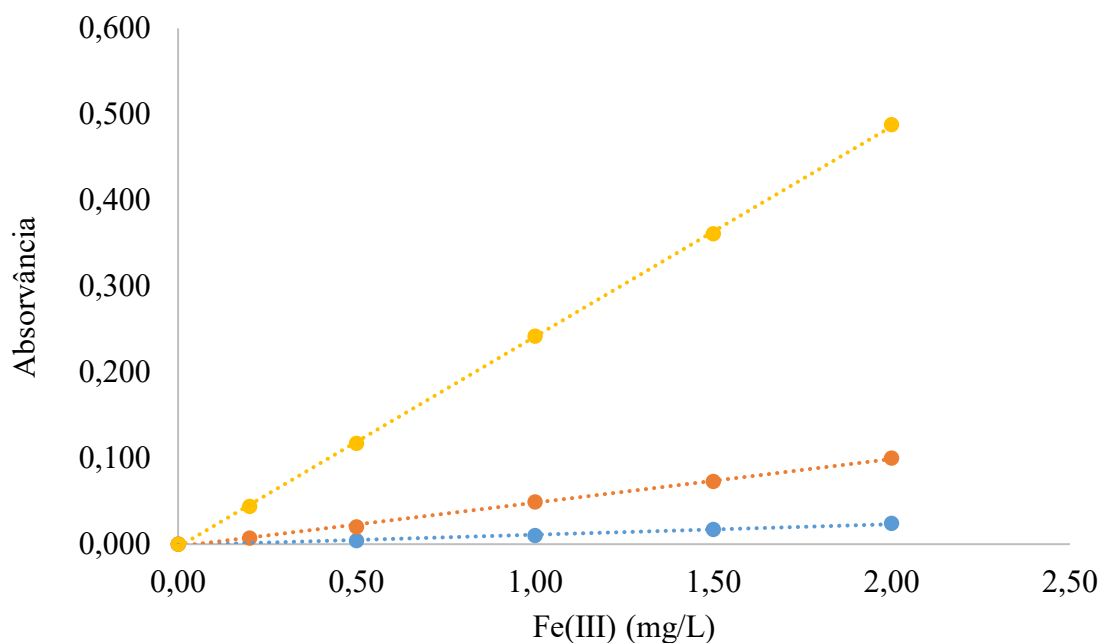


Figura 7 – Estudo para a escolha do melhor reagente para a determinação de ferro no intervalo de concentração considerado. A curva de calibração amarela, obtida com BPS, possui equação $y = 0,2445x - 0,0033$ e $r^2 = 0,9998$. A curva de calibração laranja, obtida com SCN^- , possui

equação $y = 0,0508x - 0,0025$ e $r^2 = 0,9978$. A curva de calibração azul, obtida com CP256, possui equação $y = 0,0122x - 0,0012$ e $r^2 = 0,9896$.

O gráfico obtido permite verificar que no intervalo considerado, 0,2-2,0 mg/L, em todas as reações as respostas são lineares; no entanto, os valores de absorvância observados para cada reação são muito distintos. Dado que o objetivo é trabalhar num intervalo de concentração ainda mais baixo do que este, quanto maior forem os valores de absorvância obtidos melhor será a qualidade da resposta para menores concentrações. Deste modo, a reação com o BPS aparenta ser a melhor forma de quantificar o ião ferro neste estudo. A comparação do declive das retas, que corresponde à sensibilidade das reações, consolidou esta hipótese, pois a quantificação do ião ferro com o BPS é significativamente mais sensível do que as restantes reações estudadas.

3.1.1.1. Taxa de conversão de Fe(III) em Fe(II)

Dado que o BPS reage com Fe(II) e a espécie presente na saliva é o Fe(III), implicando a realização de uma redução, e que a adição de um reagente redutor pode se traduzir no aumento de camadas do μ PAD, o que dificulta a sua montagem, estudou-se *in vitro* o modo de adição dos reagentes. Para tal, realizaram-se curvas de calibração com soluções-padrão de Fe(III) de 0,2 a 2 mg/L, testando-se a adição sequencial/separada do BPS e do agente redutor e a adição de uma solução composta por ambos os reagentes (figura 8).

A análise do gráfico obtido permite verificar que o modo de adição do BPS e da hidroxilamina não afeta significativamente a sensibilidade da reação e, portanto, que não há deterioração significativa do BPS quando em contato com o agente redutor, durante pelo menos 15 minutos. Deste modo, na transição para o μ PAD a partida não será necessária a adição de uma camada extra para o agente redutor, podendo ser utilizada uma solução que contenha ambos os reagentes em apenas uma camada.

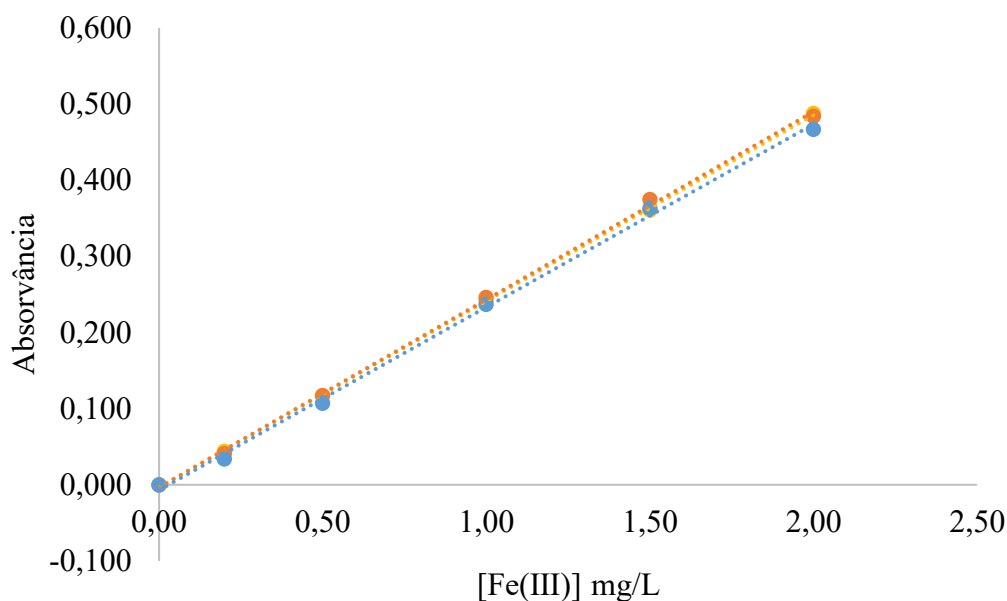


Figura 8 – Estudo da influência do modo de adição dos reagentes; A curva de calibração amarela, obtida com adição sequencial dos reagentes, possui equação $y = 0,2445x - 0,0033$ e $r^2 = 0,9998$. A curva de calibração laranja, obtida com uma solução composta por BPS e agente redutor, possui equação $y = 0,2468x - 0,0034$ e $r^2 = 0,9991$. A curva de calibração azul, obtida com uma solução composta por BPS e agente redutor após 15 minutos de reação, possui equação $y = 0,2403x - 0,0069$ e $r^2 = 0,9984$.

De seguida, estudou-se a taxa de conversão de Fe(III) em Fe(II). Para tal, realizaram-se curvas de calibração com soluções-padrão de Fe(II) e Fe(III) preparadas a partir de sólidos (figura 9). As soluções de ambas as reações apresentaram valores de pH semelhantes (pH~5). Tal como se pode verificar, não há diferenças significativas entre a sensibilidade das retas das curvas de calibração de Fe(III) e Fe(II), o que indica uma taxa de conversão muito elevada de Fe(III) a Fe(II). Após 1h (figura 10), há um aumento dos valores de absorvância em ambas as reações e da sensibilidade das retas das curvas de calibração, o que indica que a reação entre o íão ferro e o BPS não é imediata.

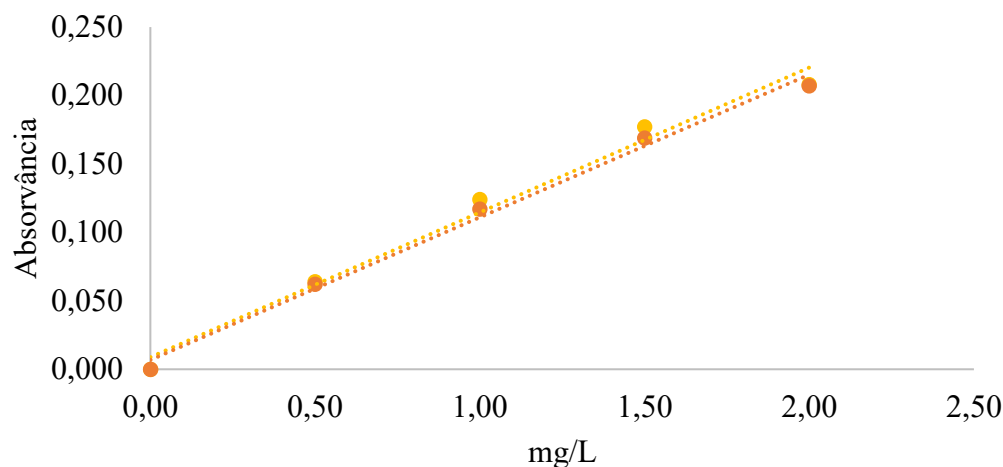


Figura 9 – Estudo da taxa de conversão de Fe(III) a Fe(II) utilizando soluções-padrão de Fe(III) e Fe(II) preparadas a partir de sólidos. A curva de calibração amarela, obtida com Fe(III), possui equação $y = 0,1058x + 0,0088$ e $r^2 = 0,9854$. A curva de calibração laranja, obtida com Fe(II), possui equação $y = 0,1042x + 0,0068$ e $r^2 = 0,9929$.

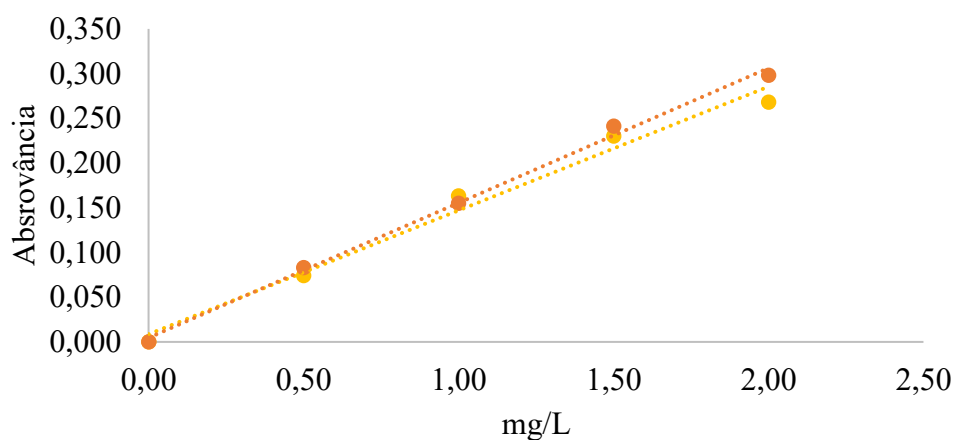


Figura 10 - Estudo da influência do tempo na sensibilidade das curvas de calibração obtidas utilizando soluções-padrão de Fe(III) e Fe(II) preparadas a partir de sólidos após 1 hora. A curva de calibração amarela, obtida com Fe(III), possui equação $y = 0,1384x + 0,0086$ e $r^2 = 0,9828$. A curva de calibração laranja, obtida com Fe(II), possui equação $y = 0,1508x + 0,0046$ e $r^2 = 0,9965$.

3.1.2. Estudo do reagente - ensaios em μ PAD

Após a realização dos estudos *in vitro*, realizaram-se ensaios em μ PAD utilizando os reagentes SCN^- e BPS de modo a determinar qual seria a reação mais sensível em papel, uma vez que o SCN^- reage diretamente com Fe(III) e a reação com o BPS necessita de uma redução prévia. Para tal, utilizaram-se μ PADs constituídos por círculos de papel filtro *Whatman* 1, com diâmetro 12,7 mm em ambas as camadas. Todos os testes foram realizados utilizando soluções-padrão de Fe(III) de 1,0 e 2,0 mg/L. As leituras dos dispositivos foram efetuadas após a sua montagem e adição de soluções-padrão, sempre pelo lado do dispositivo mais próximo do reagente.

Primeiramente, testou-se utilizar o anião tiocianato como reagente uma vez que, para além de reagir diretamente com o ferro presente na saliva, este é muito mais económico que o BPS. Testou-se montar um μ PAD com 2 camadas, alternando o posicionamento do reagente, isto é, camada B vazia e camada C com reagente (12 μL) e vice-versa, bem como diferentes volumes de solução-padrão (25 e 30 μL). A adição do reagente na camada C não produziu resposta, não sendo possível diferenciar os resultados obtidos de zero, para ambos os volumes de solução-padrão. Adicionar o reagente na camada B permitiu obter sinal pelo menos a partir de 1h, com o volume de solução-padrão de 25 μL apresentando melhor resposta do que 30 μL . Observou-se também que, ao longo do tempo, a cor do produto da reação é cada vez mais intensa e se concentra na zona do furo.

Dado que o produto colorido se concentra na zona do furo, testaram-se diferentes dimensões de furo (3,1 e 5 mm), adicionando o reagente na camada B e utilizando 25 μL de solução-padrão. Verificou-se que o aumento da dimensão do furo conduziu a uma absorção muito mais rápida das soluções-padrão, de modo que se optou pelo diâmetro de 5 mm.

No entanto, uma vez que o sinal obtido ao fim de 1h utilizando SCN^- era reduzido, testou-se utilizar uma solução contendo BPS e o agente redutor. Tal como foi feito anteriormente, estudou-se o posicionamento da solução reagente, mantendo o furo de 5 mm e os 25 μL de solução-padrão. Apesar da adição de solução reagente na camada C não ter produzido resposta, a adição na camada B permitiu obter respostas aproximadamente 5 vezes mais sensíveis do que as utilizando SCN^- . Observou-se novamente que ao longo do tempo a cor do produto da reação é cada vez mais intensa e se concentra na zona do furo.

Deste modo, concluiu-se que os ensaios em papel consolidam as conclusões tiradas nos ensaios *in vitro*: o doseamento de ião ferro utilizando o BPS é consideravelmente mais sensível do que as restantes reações testadas, mas a reação não é imediata.

3.2. Desenvolvimento do μ PAD para a determinação de Fe(III)

Ao longo destes estudos mantiveram-se constantes alguns parâmetros relativos à estrutura do dispositivo. Tal como o descrito no ponto 2.2.1., a camada A apresenta sempre aberturas de 5 mm de diâmetro e o reagente (mistura da solução redutora com BPS) é sempre adicionado à camada B. Quanto à digitalização dos dispositivos, esta foi efetuada após a sua montagem e adição de soluções-padrão, sempre pelo lado da camada A.

3.2.1. Estudo das camadas hidrofílicas

Estudaram-se diferentes tipos de papel para a camada B (*Whatman* 1, 42, 50, 541, 4 e 5), que contém o reagente, bem como o diâmetro destes (9,5 e 12,7 mm). Manteve-se na camada C, apenas responsável por permitir a absorção de um maior volume de solução adicionada, o papel de filtro *Whatman* 1, por ser o mais económico.

Primeiramente testou-se utilizar papéis de filtro com diferentes tratamentos na camada B, nomeadamente os tipos *Whatman* 1, 42, 50 e 541 e diâmetros de 12,7 mm e 9,5 mm, mantendo na camada C o diâmetro de 12,7 mm (Anexo I). Utilizando 12 μ L de reagente com BPS a 100 mg/mL e 25 μ L soluções-padrão de Fe(III) de 1,0 e 2,0 mg/L, obtiveram-se valores médios de absorvância para cada concentração de ião ferro. Comparando o declive entre estes valores para cada condição testada (figura 11) é possível observar que aos 20 minutos não se verificam diferenças significativas entre diferentes tipos de papel e diferentes dimensões deste, com exceção do tipo de papel *Whatman* 50, que ainda se encontrava húmido após esse intervalo de tempo.

Relativamente aos restantes tempos de secagem, observou-se que a condição papel *Whatman* 1 com diâmetro de 12,7 mm apresentava o menor tempo de secagem (<15 min), enquanto as restantes condições entre 15 a 20 minutos. Dado que o dispositivo deve ser económico, optou-se por utilizar na camada superior o tipo de papel *Whatman* 1, com diâmetro 9,5 mm, pois aos 20

minutos não se observam diferenças significativas nos resultados obtidos com os diferentes tipos de papel. Optou-se pela menor dimensão do papel de filtro em detrimento do tempo de secagem devido ao facto do produto colorido de concentrar na zona do furo, de modo que quanto menor a dimensão da camada contendo o reagente, mais “concentrado” o produto fica na zona do furo, o que é essencial para que se possa detetar menores valores de concentração.

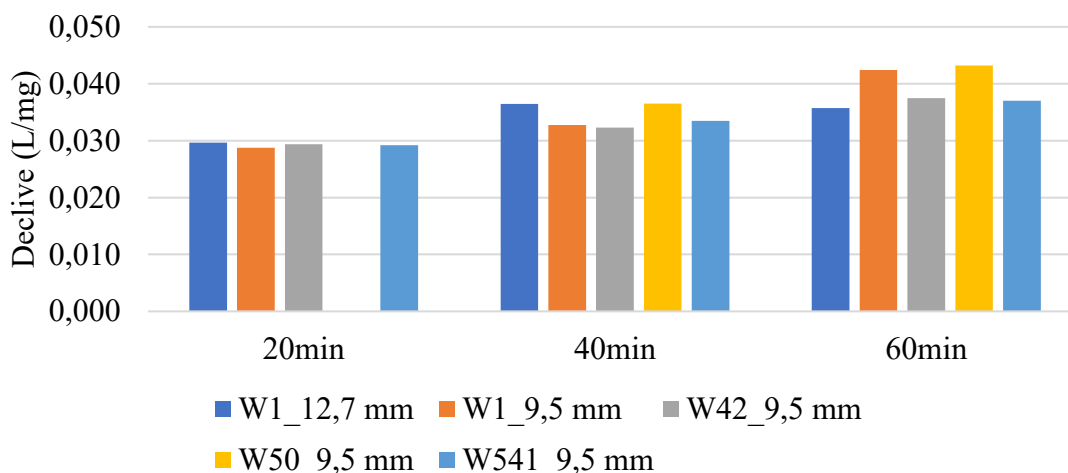


Figura 11 - Estudo da influência do tipo de papel e diâmetro dos discos na sensibilidade (declive) das curvas de calibração obtidas para as diferentes condições testadas ao longo do tempo.

De seguida, numa tentativa de acelerar o processo de secagem, testou-se aumentar o diâmetro da camada C de 12,7 mm para 14 mm. Para tal, adicionou-se 12 μ L de reagente com BPS a 1 mg/mL à camada B (papel de filtro *Whatman* 1 e diâmetro de 9,5 mm) e realizaram-se curvas de calibração com 25 μ L de soluções padrão de 0,25 a 1,5 mg/L (figura 12). Tal como se pode observar, aos 20 minutos não há diferenças significativas entre os declives das curvas de calibração obtidas para os diferentes diâmetros testados. No entanto, verificou-se que a absorção das soluções foi mais rápida (<15min) no dispositivo com camada C de diâmetro 14 mm. Deste modo, optou-se por aumentar a dimensão da camada C, pois permite garantir que o μ PAD se encontra o mais seco possível no momento da digitalização.

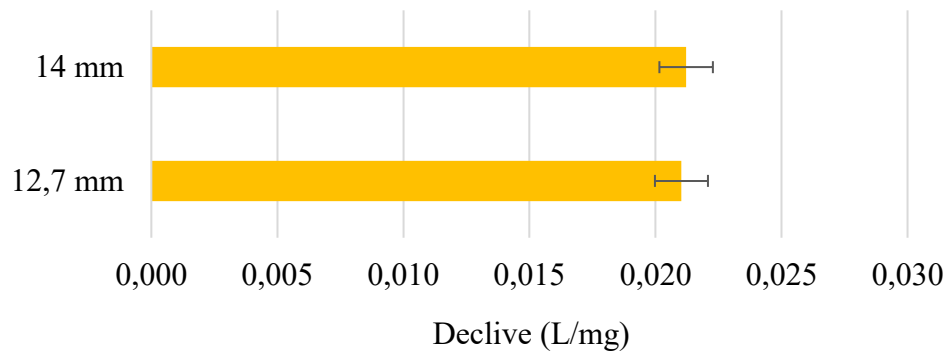


Figura 12 - Estudo do efeito do diâmetro da camada C na sensibilidade das curvas de calibração ao fim de 20 minutos. As barras de erro representam uma variação de 5%.

Por fim, estudou-se o tamanho do poro do papel, isto é, testaram-se papeis com o mesmo tratamento, mas tamanhos de poro diferentes (Anexo I), nomeadamente os tipos de papel *Whatman* 1, 4 e 5, mantendo as seguintes condições: diâmetro de 9,5 mm na camada B e 14 mm na camada C e 12 μ L de reagente com BPS a 1 mg/mL. Para tal, foram realizadas curvas de calibração com soluções padrão de 0,25 a 1,5 mg/L e comparou-se os declives das curvas de calibração obtidas para cada condição (figura 13). Tal como se pode observar, aos 20 minutos o resultado obtido com o tipo de papel W1 apresenta maior valor de declive, isto é, sensibilidade, de modo que se manteve este papel de filtro na camada B.

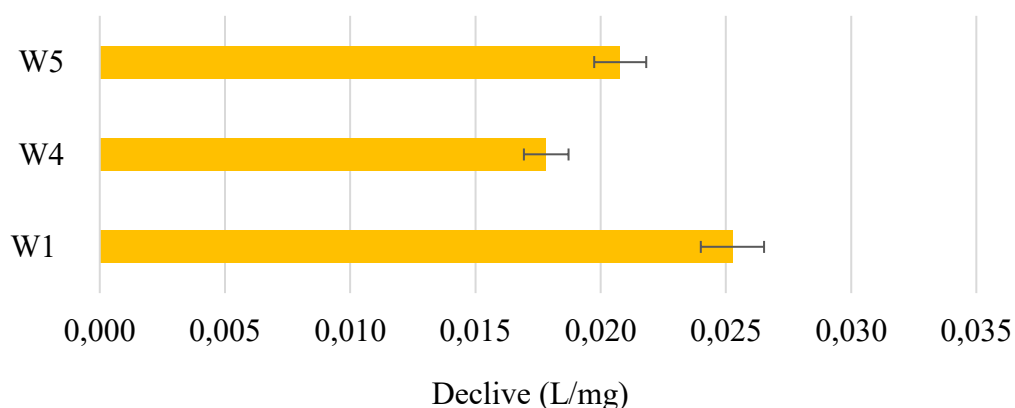


Figura 13 - Estudo da influência do diâmetro de poro do papel da camada B na sensibilidade das curvas de calibração obtidas ao fim de 20 minutos. As barras de erro representam uma variação de 5%.

3.2.2. Estudo da concentração de BPS

De forma a estudar o efeito da concentração do BPS realizaram-se curvas de calibração com o reagente (12 μ L) contendo diferentes concentrações de BPS, 100 mg/mL, 1 mg/mL e 0,5 mg/mL, garantindo sempre um excesso relativamente à quantidade estequiométrica para as soluções padrão de 0,5 a 1,5 mg/L (25 μ L). Comparando os declives das curvas de calibração obtidas (figura 14) é possível concluir que quanto maior a concentração do reagente, maior é o declive e, consequentemente, a sensibilidade do dispositivo.

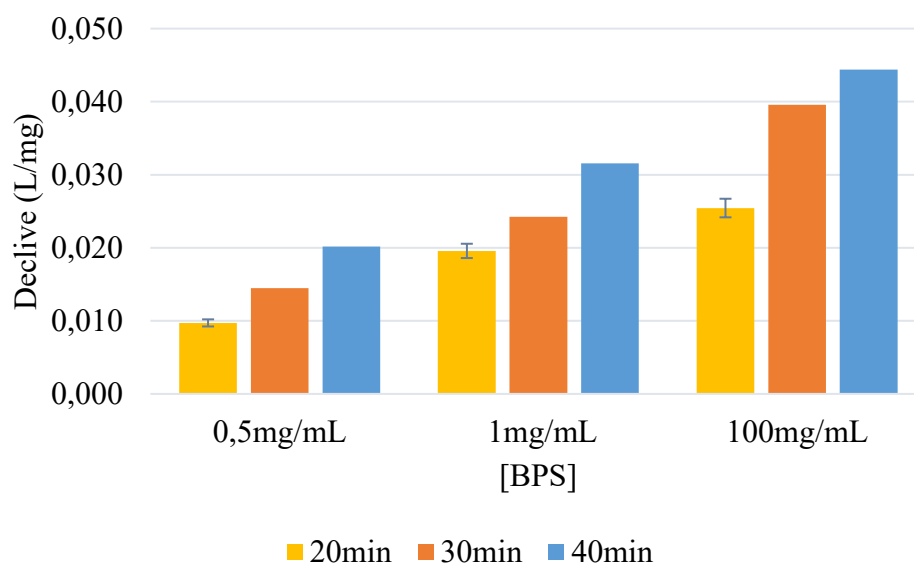


Figura 14 – Estudo da influência da concentração de BPS na sensibilidade das curvas de calibração ao longo do tempo. As barras de erro representam uma variação de 5%.

No entanto, aos 20 minutos, a diferença de declive que se observa para as concentrações de 1 e 100 mg/mL se deve às soluções-padrão de maior concentração, 1,0 e 1,5 mg/L, verificando-se sobreposição dos valores de absorvância obtidos para a solução-padrão de menor concentração (figura 15). Deste modo, uma vez que o intervalo de valores de concentração pretendido (< 1,0 mg/L) é inferior ao em consideração e que o valor de absorvância obtido aparenta ser semelhante para concentrações de Fe(III) inferiores a 1 mg/L, optou-se por utilizar o BPS numa concentração de 1 mg/mL. A utilização de uma concentração menor de BPS permite que o dispositivo seja mais

económico, uma vez que o custo do reagente é elevado, sem colocar em detrimento a sensibilidade da medição.

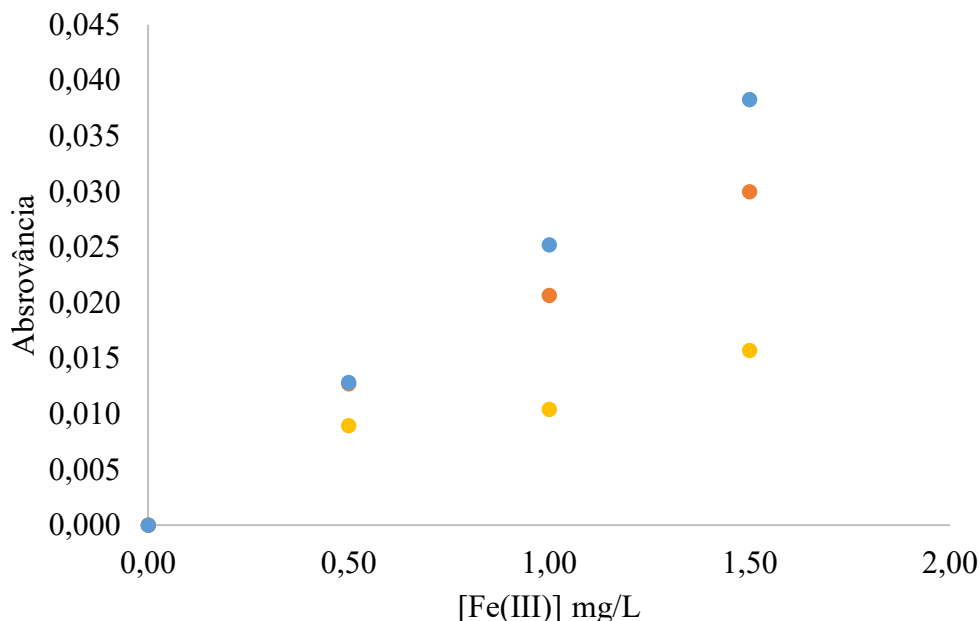


Figura 15 – Estudo da influência da concentração de BPS na sensibilidade das curvas de calibração ao fim de 20 minutos. Círculos amarelos representam valores de absorvância obtidos utilizando a concentração de 0,5 mg/mL. Círculos laranja representam valores de absorvância obtidos utilizando a concentração de 1 mg/mL. Círculos azuis representam valores de absorvância obtidos utilizando a concentração de 100 mg/mL.

3.2.3. Estudo do volume de reagente

Estudou-se de seguida o volume de solução reagente (mistura das soluções de reagente colorimétrico e agente redutor), contendo BPS a 1 mg/mL. Para tal, à camada B do μ PAD foram adicionados diferentes volumes de reagente (8, 10, 12, 15 e 18 μ L). Após a montagem dos dispositivos foram adicionadas soluções-padrão de Fe(III) de 0,5 a 1,5 mg/L e, após 30 minutos, realizou-se a digitalização dos μ PADs. Com os valores obtidos realizaram-se curvas de calibração, cujos declives encontram-se representados no gráfico abaixo (figura 16).

Foram testados maiores volumes de solução reagente, 15 e 18 μL , a fim de confirmar a conclusão tirada no estudo da concentração do BPS (que uma maior quantidade de BPS não conduz necessariamente a uma melhor sensibilidade para o intervalo de concentração e tempo de reação desejados). Para este teste foram utilizados papéis de filtro *Whatman* 1 com diâmetro de 12,7 mm na camada B, uma vez que estes volumes (15 e 18 μL) estão acima da capacidade de absorção máxima suportada pelos papéis de 9,5 mm de diâmetro. Como se pode observar, o aumento do volume de reagente e, conseqüentemente, da quantidade de BPS, não conduz a uma melhor resposta no período considerado, provavelmente porque o tempo de secagem não é suficiente para uma leitura fiável do dispositivo.

Testou-se também reduzir o volume de reagente para 10 e 8 μL . Tal como se pode verificar, os intervalos de confiança de 95% para as sensibilidades obtidas com os volumes de reagente de 10 e 12 μL são os únicos que se sobrepõem. Deste modo, optou-se pelo volume de 10 μL em detrimento do de 12 μL , pois com menos quantidade de reagente é possível obter igual resposta, o que contribui para a redução do custo do dispositivo.

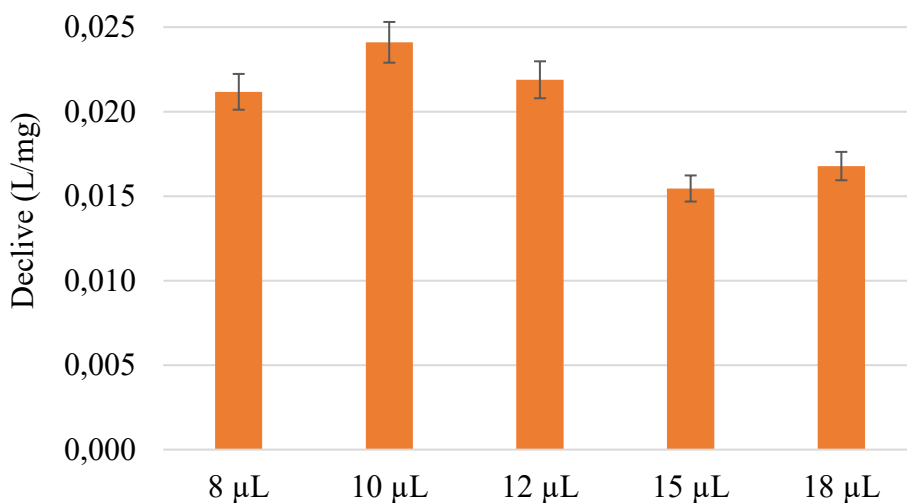


Figura 16 - Estudo da influência do volume de solução reagente na sensibilidade das curvas de calibração ao fim de 30 minutos. As barras de erro representam uma variação de 5%.

3.2.4. Estudo do volume de amostra

Estudou-se o efeito do volume de solução padrão a fim de verificar se uma maior quantidade de amostra poderia resultar em uma melhor sensibilidade. Para tal, foram realizadas curvas de calibração utilizando 25 e 30 μL de soluções padrão de 0,125 a 0,750 mg/L. Ao comparar os intervalos de confiança de 95% associados a cada declive obtido é possível observar que estes não se sobrepõem, com o volume de 25 μL proporcionando melhor sensibilidade (figura 17). Deste modo, uma vez que é possível detetar 0,125 mg/L com ambos os volumes de amostra, optou-se pelo volume de 25 μL pelo facto de possuir um menor tempo de secagem comparativamente ao de 30 μL e porque quanto menor for o volume de amostra mais fácil é a amostragem para o utente.

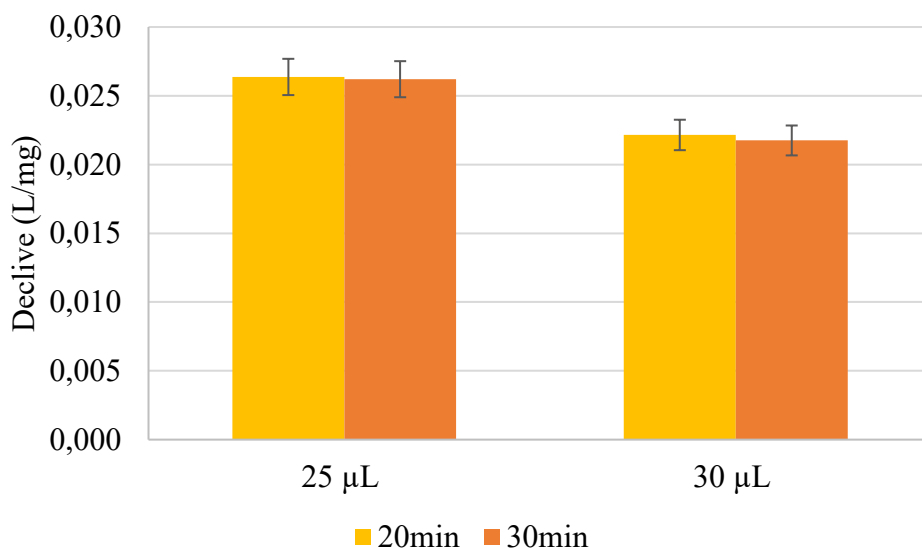


Figura 17 - Estudo da influência do volume de solução-padrão na sensibilidade das curvas de calibração ao fim de 20 e 30 minutos. As barras de erro representam uma variação de 5%.

3.2.5. Estudo da percentagem de conversão de Fe(III) a Fe(II)

Tal como *in vitro*, foi necessário estudar a taxa de conversão de Fe(III) a Fe(II) em papel. Para tal, utilizando 25 μL de soluções padrão de 0,5 mg/L de Fe(II) e Fe(III) preparadas a partir de sólidos e Fe(III) preparada a partir de solução-mãe para EAA (figura 18), obtiveram-se valores médios de absorvância para os produtos de reação obtidos com cada solução padrão. Comparando os

intervalos de confiança de 95% associados a estes valores, é possível verificar que há sobreposição dos intervalos de confiança, o que indica que não há diferenças significativas entre os valores de absorvância obtidos com as diferentes soluções padrão. Deste modo, é possível concluir que a taxa de conversão de Fe(III) a Fe(II), nas condições estudadas, é muito elevada.

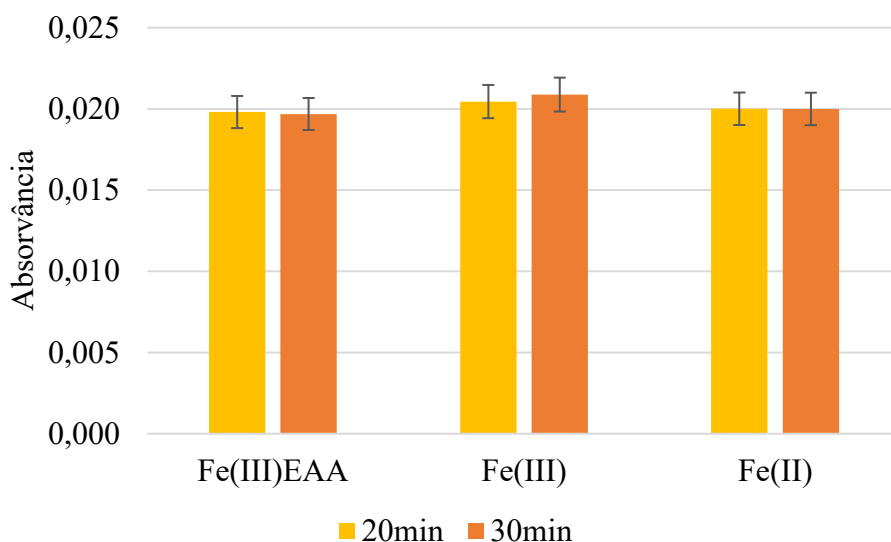


Figura 18 - Valores médios de absorvância obtidos utilizando diferentes fontes de Ião ferro aos 20 e 30 minutos. As barras de erro representam uma variação de 5%.

3.3. Estudo de interferências

3.3.1. Estudo de interferências da matriz da amostra

A quantificação de Ião ferro na saliva pode estar sujeita a diversas interferências devido a natureza complexa da composição salivar. Assim, o estudo de potenciais interferentes da matriz da saliva consistiu na realização de curvas de calibração utilizando soluções padrão de 0,125 a 0,750 mg/L em diferentes matrizes: água ultrapura, saliva sintética com proteínas e saliva sintética sem proteínas (figura 19). Uma vez que há sobreposição dos intervalos de confiança de 95% associados aos declives das curvas de calibração obtidas com a matriz de água ultrapura e saliva sintética sem proteínas, é possível afirmar que não há diferenças significativas entre estes resultados. No entanto,

ambos são extremamente distintos do resultado obtido com a saliva sintética contendo proteínas. Deste modo, é possível concluir que a presença de proteínas salivares constitui uma interferência na determinação do íon ferro. Espera-se que o modo de amostragem contribua para minimizar esta interferência, visto que as proteínas podem ficar retidas na gaze.

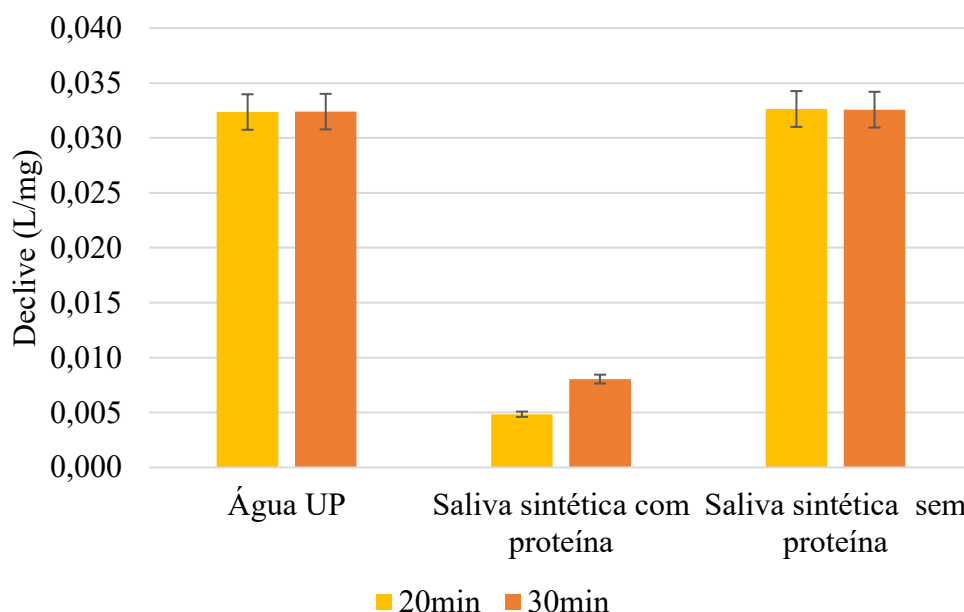


Figura 19 - Estudo da influência da matriz salivar com e sem proteínas na sensibilidade das curvas de calibração aos 20 e 30 minutos. As barras de erro representam uma variação de 5%.

3.3.2. Estudo da interferência do Cu(II)

O reagente BPS também pode reagir com o cobre [25], que pode estar presente na saliva humana normalmente em menores concentrações que o ferro [15]. Deste modo, estudou-se a interferência deste íon na reação entre o BPS e o ferro. Para tal, comparou-se a média dos valores de absorvância obtidos utilizando 25 μ L de soluções-padrão contendo apenas Fe(III) (0,3 mg/L), Fe(III) e Cu(II) em igual proporção (0,3 mg/L) e Fe(III) e Cu(II) na proporção 1:1/2 (0,3 e 0,15 mg/L, respetivamente) (figura 20). Como se pode observar, há sobreposição dos intervalos de confiança de 95%, o que permite concluir que não há diferenças significativas entre os valores de absorvância obtidos. Sendo assim, é possível afirmar que para as proporções estudadas não há interferências significativas do cobre na quantificação de ferro salivar.

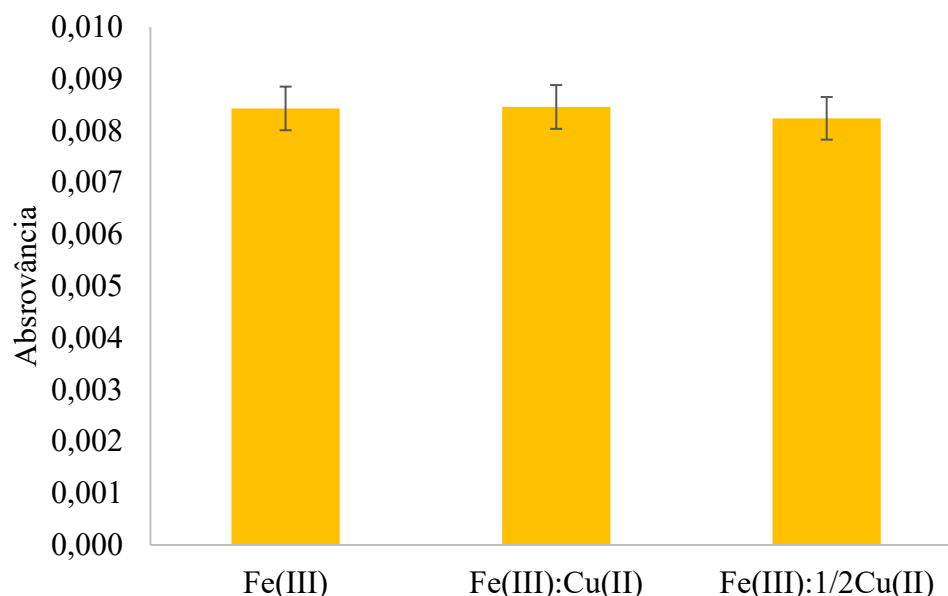


Figura 20 - Estudo da influência da presença de cobre nos valores de absorvância obtidos ao fim de 20 minutos. As barras de erro representam uma variação de 5%.

3.4. Estudos de estabilidade no dispositivo

Para os estudos de estabilidade foram utilizados dispositivos otimizados, cuja a estrutura se encontra descrita no ponto 2.2.1.; a camada A apresenta aberturas de 5 mm de diâmetro, a camada B, onde adicionam-se 10 μL de reagente (mistura da solução redutora com BPS a 1 mg/mL), é constituída por círculos de papel de filtro *Whatman* 1 com diâmetro de 9,5 mm e a camada C é constituída por círculos de papel de filtro *Whatman* 1 com diâmetro de 14 mm. A digitalização dos dispositivos foi efetuada sempre pelo lado da camada A, após a montagem do dispositivo e adição de 25 μL de solução-padrão de Fe(III).

O estudo da estabilidade foi realizado com a adição de fita-cola sobre a zona dos furos imediatamente antes de se realizar a digitalização do dispositivo uma vez que esta etapa é essencial para a segurança do utilizador do dispositivo, pois permite que este evite contato com o fluido biológico em estudo.

3.4.1. Estudo da estabilidade do produto de reação

A estabilidade do produto de reação foi estudada com o sem o efeito da fita-cola, de forma a se verificar o efeito desta etapa. Para tal, utilizando soluções-padrão de Fe(III) de 0,5 a 1,5 mg/L, realizaram-se duas curvas de calibração, onde numa adicionou-se fita-cola previamente à digitalização. Tal como se pode observar na figura 21, aos 20 minutos não se observam diferenças significativas entre os resultados obtidos com e sem adição de fita-cola, de forma que é possível concluir que esta etapa não interfere com a leitura do dispositivo. No entanto, a adição da fita-cola tem um efeito estabilizador no produto de reação, uma vez que reduz as diferenças de declive observadas ao longo do tempo devido ao tempo de reação. Este efeito é positivo, pois permite ao utilizador digitalizar o dispositivo quer 20, quer 60 minutos após a adição da amostra, uma vez que os valores se mantêm neste intervalo de tempo. Deste modo, conclui-se que a adição da fita-cola não só é viável, permitindo obter resultados fidedignos e assegurando a segurança do operador, como também permite estabilizar o produto da reação por 1 hora.

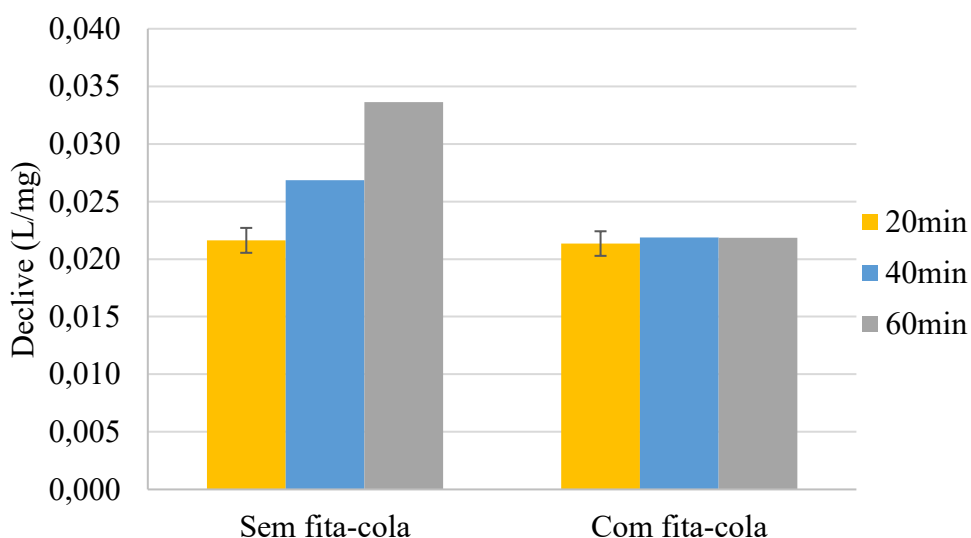


Figura 21 - Estudo da influência da adição de fita-cola na sensibilidade das curvas de calibração ao longo do tempo. As barras de erro representam uma variação de 5%.

3.4.2. Estudo da estabilidade do dispositivo

A estabilidade do μ PAD desenvolvido foi testada em diferentes condições de armazenamento ao longo do tempo. Os μ PADs foram montados e armazenados em contato com o ar (com exposição ao oxigénio) e a vácuo (sem exposição ao oxigénio) durante 24h, 48h, 1 semana e 1 mês. Após estes intervalos de tempo, adicionou-se soluções-padrão aos μ PADs e realizou-se a digitalização destes aos 20 e 30 minutos. Aquando a leitura dos μ PADs foram também realizadas curvas de calibração novas. O gráfico abaixo (figura 22) representa o declive, isto é, a sensibilidade das curvas de calibração obtidas para cada tipo de armazenamento e período, para ambos os tempos de leitura. As duas primeiras barras representam a média das curvas de calibração do próprio dia aos 20 e 30 minutos. Tal como se pode observar, todos os declives dos períodos e tipos de armazenamento se encontram incluídos nos intervalos de confiança de 90% associados às curvas de calibração do próprio dia. Deste modo, é possível concluir que não há diferenças significativas entre os declives obtidos e, portanto, que o μ PAD permanece estável pelo menos durante 1 mês em qualquer modo de armazenamento.

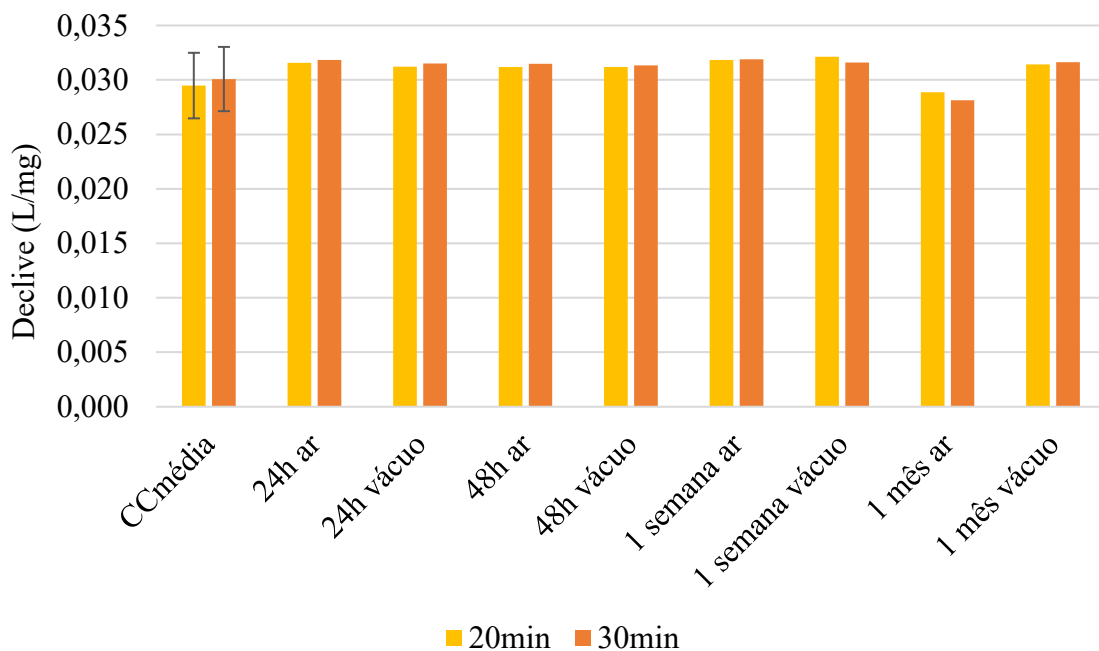


Figura 22 - Estudo da influência de diferentes condições de armazenamento do dispositivo na sensibilidade das curvas de calibração; CCmédia– média do declive das curvas de calibração realizadas no próprio dia, com as respetivas barras de erro de 10%.

3.5. Aplicação – estudo da exatidão da determinação

3.5.1. Amostra certificada de água

Utilizou-se uma amostra de água certificada (ver 2.4.) diluída para as concentrações de 0,255 e 0,170 mg/L de Fe(III). As concentrações de ião ferro detetadas nas amostras com o dispositivo desenvolvido foram de 0,167 e 0,250 mg/L, ambas correspondendo a um desvio relativo em relação à concentração conhecida de -2%. Dado que os valores de desvio relativo obtidos são ambos menores que 10%, foi possível concluir que o μ PAD desenvolvido deteta de modo rigoroso o ião de ferro em amostras de água, no intervalo de concentrações estudado.

3.5.2. Amostras de saliva

A amostragem foi realizada de acordo com o descrito em 2.3. O quadro abaixo (tabela 2) resume os valores de concentração de ião ferro detetados com o dispositivo nas amostras de saliva com e sem adição de solução-padrão de Fe(III) (0,333 mg/L). Como se pode verificar, não houve deteção de ião ferro nas amostras sem adição. No caso das amostras com adição, observou-se deteção de aproximadamente 50% da concentração adicionada. Isto provavelmente deve-se ao facto de existirem interferentes na matriz salivar.

Tabela 2 - Quadro com as concentrações de ião ferro detetadas nas amostras de saliva com e sem adição, ao fim de 20 e 30 minutos.

		Concentração de Fe(III) (mg/L)		
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
20min	Sem adição	-0,022	0,008	-0,076
	Com adição	0,159	0,155	0,158
30min	Sem adição	-0,011	0,028	-0,081
	Com adição	0,161	0,252	0,158

Testou-se levar as amostras de saliva à EAA, como método de comparação, porque este é convencionalmente utilizado para dosar cátions metálicos. No entanto, não se observou correlação entre os valores obtidos em EAA e os obtidos com o dispositivo.

3.6. Características do μ PAD

As características do μ PAD desenvolvido, nomeadamente o intervalo de concentração, a curva de calibração, os limites de detecção e quantificação, o intervalo de leitura e a estabilidade encontram-se resumidas na tabela abaixo (tabela 3).

O cálculo para os limites de detecção e quantificação foram feitos de acordo com as recomendações da IUPAC [31].

Tabela 3 – Quadro resumo das características do μ PAD desenvolvido para a determinação de ferro.

Intervalo de concentração (mg/L)	0,125 – 0,750
Curva de calibração* $A = S \times [Fe^{3+}] + b$	$A = 3,23 \times 10^{-2}(\pm 6,77 \times 10^{-4}) \times [Fe^{3+}]$ $+ 2,94 \times 10^{-4}(\pm 2,63 \times 10^{-4})$ $R^2 = 0,997$
Limite de detecção	0,0336
Limite de quantificação (mg/L)	0,0907
Intervalo de leitura (min)	20 – 60
Estabilidade	1 mês a vácuo ou ar

*n=10, número de curvas de calibração utilizadas para os cálculos.

A reprodutibilidade do μ PAD desenvolvido foi testada através da realização de diversas curvas de calibração. No gráfico abaixo (figura 23) estão representados os declives de curvas de calibração feitas em diferentes dias, bem como as respectivas barras de erro de 5%, para tempos de leitura de 20 e 30 minutos. Como se pode verificar, há sobreposição dos intervalos de confiança de todas as curvas para ambos os tempos de leitura, de modo que se pode concluir que não há diferenças significativas entre as sensibilidades obtidas, garantindo assim a reprodutibilidade do método desenvolvido.

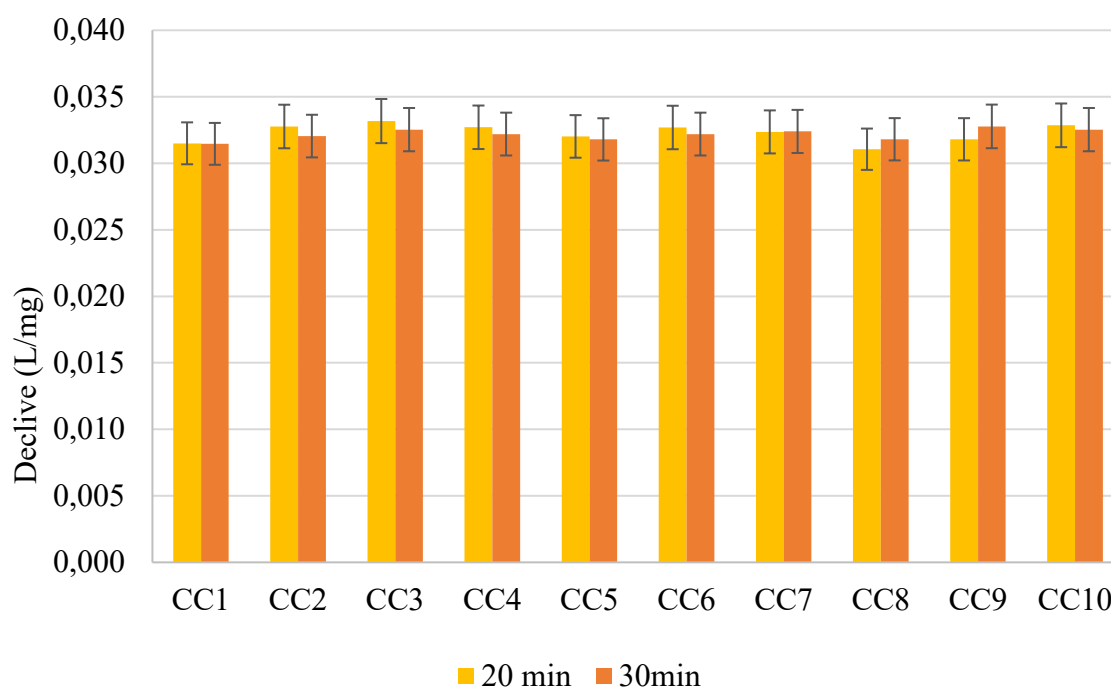


Figura 23 - Declives das curvas de calibração realizadas em diferentes dias, bem como as respectivas barras de erro de 5%.

A repetibilidade do μ PAD desenvolvido foi testada através da realização de 4 curvas de calibração no mesmo dia. No gráfico abaixo (figura 24) estão representados os declives de cada curva de calibração, bem como as respectivas barras de erro de 5%, para tempos de leitura de 20 e 30 minutos. Como se pode verificar, há sobreposição dos intervalos de confiança de todas as curvas para ambos os tempos de leitura, de modo que se pode concluir que não há diferenças significativas entre as sensibilidades obtidas.

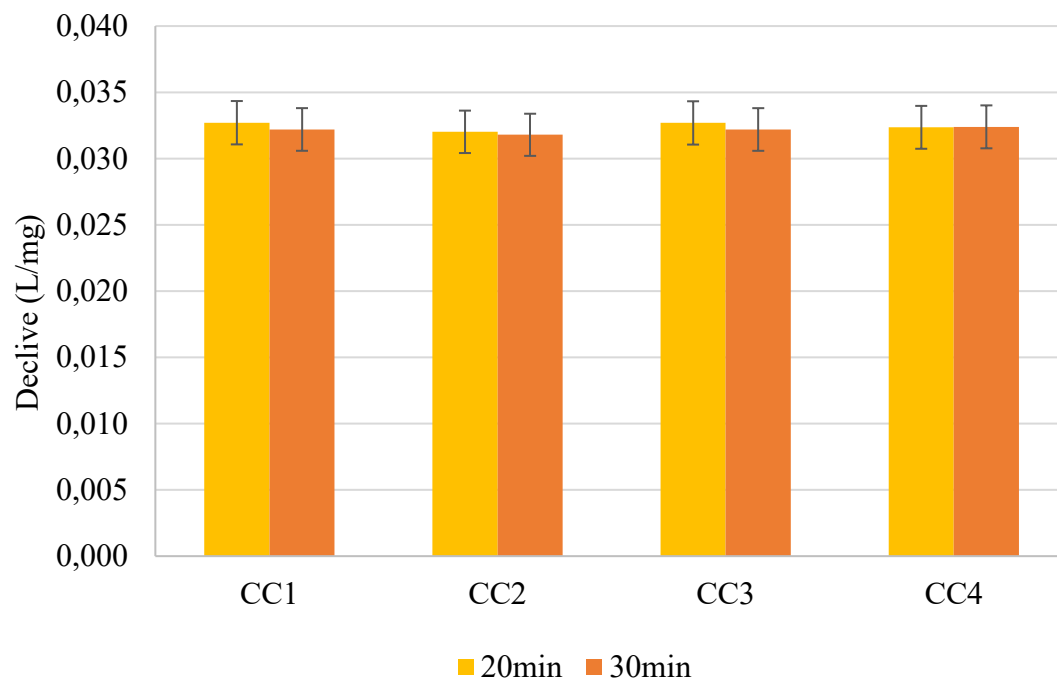


Figura 24 –Declives das curvas de calibração realizadas no mesmo dia, bem como as respectivas barras de erro de 5%.

4. Conclusão e sugestões de trabalho futuro

Este trabalho permitiu desenvolver um dispositivo baseado em papel para a quantificação de ferro salivar, uma vez que esta determinação pode constituir um potencial exame diagnóstico complementar para doenças como o cancro oral e anemia. O método desenvolvido vai ao encontro das recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) para ferramentas de diagnóstico de aplicação em países em desenvolvimento, onde os recursos são limitados, sendo económico, sensível, específico, fácil de utilizar, não necessita de instalações especializadas, rápido e robusto.

O dispositivo desenvolvido foi otimizado para detetar ferro, através da reação colorimétrica com o BPS, no intervalo de concentrações de 0,125-0,750 mg/L, apresentando uma estrutura final de duas camadas de papel de filtro *Whatman* 1. A camada superior (camada B) possui um diâmetro de 9,5 mm e nela são adicionados 10 µL de solução reagente contendo BPS e hidroxilamina. A camada inferior (camada C) possui um diâmetro de 14 mm e os orifícios na bolsa de plastificar (camada A) que permitem a adição da amostra possuem 5 mm de diâmetro.

Uma vez que este dispositivo foi desenvolvido com o objetivo de analisar amostras salivares, realizou-se um estudo de interferências, utilizando soluções de saliva sintética com e sem proteínas, onde se observou que a presença de proteínas constitui um interferente na determinação em causa.

Devido à existência de interferentes na matriz salivar, não foi possível finalizar a validação do método com amostras de saliva, verificando-se apenas que em amostras com adição há deteção de aproximadamente 50% da concentração adicionada. No entanto, através de amostras certificadas de água foi possível demonstrar que o dispositivo determina rigorosamente o ferro em águas, validando assim a aplicação do método desenvolvido para este tipo amostras.

Sendo assim, é possível concluir que o dispositivo desenvolvido satisfaz as recomendações da OMS para análises em locais com recursos limitados, permitindo quantificar de forma portátil, rápida e fácil o ferro em águas. No entanto, este estudo não está concluído, sendo necessário em trabalhos futuros otimizar a aplicação do método para matrizes salivares, através, por exemplo, da modificação do dispositivo ou do método de amostragem/tratamento da amostra.

Anexo

I. Características gerais dos papeis de filtro *Whatman*

General Properties of Whatman Filter Papers											
Whatman Grade	Particle Retention (Liquid) (Um)	Initial Filtration Speed (Secs/100 ml) Herzberg	ASTM	Ash %	Thickness (mm)	Weight (g/m ²)	Loading Capacity	Wet Burst kPa	psi	Dry Burst kPa	psi
Qualitative											
1	11	150	40	0.06	0.18	87	N	1.7	0.25	97	14
2	8	240	55	0.06	0.19	97	N	2.0	0.29	110	16
3	6	325	90	0.06	0.39	185	H	2.8	0.40	193	28
4	20-25	37	12	0.06	0.21	92	N	1.5	0.22	69	10
5	2.5	1420	250	0.06	0.20	100	N	2.8	0.40	172	25
6	3	715	175	0.1-0.2	0.18	100	N	1.7	0.25	124	18
General Purpose and Wet - Strengthened											
113	30	28	8	NA	0.42	125	VH	62.1	9	200	29
114	25	38	12	NA	0.19	75	N	55.2	8	138	20
Ashless Quantitative											
40	8	340	75	0.007	0.21	95	N	2.0	0.29	110	16
41	20-25	54	12	0.007	0.22	85	N	1.5	0.22	69	10
42	2.5	1870	240	0.007	0.20	100	N	2.8	0.40	172	25
43	16	155	40	0.007	0.22	95	N	2.0	0.29	90	13
44	3	995	175	0.007	0.18	80	N	2.0	0.29	117	17
Hardened Low Ash											
50	2.7	2685	250	0.015	0.12	97	N	41.4	6	221	32
52	7	235	55	0.015	0.18	96	N	48.3	7	200	29
54	20-25	39	10	0.015	0.19	90	N	48.3	7	131	19
Hardened Ashless											
540	8	200	55	0.006	0.16	85	N	48.3	7	186	27
541	20-25	34	12	0.006	0.16	78	N	48.3	7	117	17
542	2.7	2510	250	0.006	0.15	96	N	41.4	6	221	32

Referências

- [1] Almeida, P. *et al.* (2008) Saliva composition and functions: a comprehensive review. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 9(3):072-080.
- [2] Johan K.M. and Martens L. (2005) Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Science International*, 150:119-131.
- [3] Chiappin, S. *et al.* (2007) Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*, 383:30-40.
- [4] Moura *et al.* (2007) Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas: uma revisão de literatura. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 7(2):187-194.
- [5] Wang, R. *et al.* (2012) The influence of iron availability on human salivary microbial community composition. *Environmental Microbiology*, 64(1): 152–161.
- [6] Berlutti, F. *et al.* (2011) Lactoferrin and oral diseases: current status and perspective in periodontitis. *Annali di Stomatologia*, 2(3-4):10-18.
- [7] Shetty, S. *et al.* (2015) Status of trace elements in saliva of oral precancer and oral cancer patients. *J Cancer Res Ther*, 11(1):146-149.
- [8] Canatan, D.; Akdeniz, S. (2012) Iron and ferritin levels in saliva of patients with thalassemia and iron deficiency anemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 4(1):e2012051.
- [9] Souza, R.; Menezes, L. (2008) Nickel, chromium and iron levels in the saliva of patients with simulated fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod*, 78(2):345-350.
- [10] Okade, AR. *et al.* (2015) Salivary estimation of copper, iron, zinc and manganese in oral submucous fibrosis patients: A case-control study. *Clin Cancer Investig J*, 4:302-306.
- [11] Kodati, S. (2018) Correlation of serum & salivary ferritin levels in iron deficiency anemia patients. *Int J Biol Med Res*, 9(2):6317-6320.
- [12] Arash, V. *et al.* (2012) Measurement of iron, magnesium and chromium concentrations in the saliva of the patients undergoing fixed orthodontic treatment. *Caspian J Dent Res*, 1(1):27-31.

- [13] Dziewulska, A. *et al.* (2013) Salivary mineral composition in patients with oral cancer. *Magnesium Research*, 26(3):120-124.
- [14] Shetty, S. *et al.* (2014) Status of salivary iron in oral cancer and oral potentially malignant disorders. *Journal of Cranio-Maxillary Diseases*, 3:17-20.
- [15] Kode, M.; Karjodkar, F. (2013) Estimation of the serum and the salivary trace elements in OSMF patients. *J Clin Diagn Res*, 7(6):1215-1218.
- [16] García, R; Báez, A. (2012) Atomic Absorption Spectrometry (AAS). InTech. Acedido em 09 de outubro de 2019 em www.intechopen.com/books/atomic-absorption-spectroscopy/atomic-absorption-spectrometry-aas-
- [17] Torres, K. *et al.* (2006) Recentes avanços e novas perspectivas dos eletrodos íon-seletivos. *Quim. Nova*, 29(5):1094-1100.
- [18] Martinez, A. *et al.* (2010) Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical Chemistry*, 82:3-10.
- [19] Nguyen, Nam-Trung. *et al.* (2017) Recent advances and future perspectives on microfluidic liquid handling. *Micromachines*, 8(6), 186.
- [20] Almeida, M. *et al.* (2018) Developments of microfluidic paper-based analytical devices (μPADs) for water analysis: A review. *Talanta*, 177:176–190.
- [21] Ghosh, R. *et al.* (2019) Fabrication of laser printed microfluidic paper-based analytical devices (LP-μPADs) for point-of-care applications. *Nature Scientific Reports*, 9:7896. Acedido em www.nature.com/articles/s41598-019-44455-1.pdf a 18 de outubro de 2019.
- [22] Paper microfluidic devices: a review 2017. Elveflow. Acedido em www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/paper-microfluidic-devices-a-review-2017/ a 18 de outubro de 2019.
- [23] Jiang, X.; Fan, Z.H. (2016) Fabrication and operation of paper-based analytical devices. *Annual review of analytical chemistry*, 9(1): 203-22.
- [24] Woods, J.; Mellon, M. (1941) Thiocyanate Method for Iron: A Spectrophotometric Study. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 13(8): 551-554.

- [25] Marczenko, Z.; Balcerzak, M. (2000) *Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis*. Vol. 10, 1st ed., Amsterdam: Elsevier Science.
- [26] Hirayama, T.; Nagasawa, H. (2017) Chemical tools for detecting Fe ions. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 60(1): 39–48.
- [27] Nunes, A. *et al.* (2010) Fluorescent 3-hydroxy-4-pyridinone hexadentate iron chelators: intracellular distribution and the relevance to antimycobacterial properties. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15: 861–877.
- [28] Miranda, J. *et al.* (2016) Iron speciation in natural waters by sequential injection analysis with a hexadentate 3-hydroxy-4-pyridinone chelator as chromogenic agent. *Talanta*, 148: 633-640.
- [29] Santos, I. *et al.* (2015) Iodine speciation in coastal and inland bathing waters and seaweeds extracts using a sequential injection standard addition flow-batch method. *Talanta*, 133: 7–14.
- [30] Batista, G. *et al.* (2016) Artificial saliva formulations versus human saliva pretreatment in dental erosion experiments. *Caries Res.*, 50: 78–86.
- [31] Currie, L. (1995) Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure & Appl. Chem.*, 67(10): 1699-1723.